

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年5月22日 (22.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/042382 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 5/10, A01K 67/027 4-2-8-606 Tokyo (JP). 石田 満理 (ISHIDA, Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都 町田市 南大谷 9 1 4 番地 株式会社ジェンコム内 Tokyo (JP). 加藤 稔 (KATO, Minoru) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都 町田市 南大谷 9 1 4 番地 株式会社ジェンコム内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/11831
- (22) 国際出願日: 2002年11月13日 (13.11.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-348705  
2001年11月14日 (14.11.2001) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ジェンコム (GENCOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都 町田市 南大谷 1 1 号 Tokyo (JP). 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 勝木 元也 (KAT-SUKI, Motoya) [JP/JP]; 〒106-0032 東京都 港区 六本木 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ES CELLS WITH ENHANCED RNAi EFFECT

(54) 発明の名称: RNA i 効果が増強したES細胞

(57) Abstract: It is intended to obtain ES cells and a mammalian individual having an enhanced RNAi effect and being usable in gene function analysis in an individual. Thus, ES cells having an enhanced RNAi effect which are obtained genetically manipulating ES cells are provided.

(57) 要約:

本発明の目的は、個体での遺伝子機能解析に用いることが可能な、RNA i 効果が増強されたES細胞並びに哺乳動物個体を取得することである。本発明によれば、ES細胞に遺伝子操作を施すことにより得られる、増強したRNA i 効果を有するES細胞が提供される。

## 明細書

## RNA i 効果が増強したES細胞

## 技術分野

本発明は、RNA i 効果が増強したES細胞、より詳細には、ES細胞に遺伝子操作を施すことにより得られる増強したRNA i 効果を有するES細胞に関する。

## 背景技術

これまで、個体レベルにおけるDNAの機能解明においては、遺伝子ノックアウト動物を作成し、その表現系を解析するという方法で行われてきた。しかしながら、このノックアウト法は多大な労力と時間がかかり、数多くの遺伝子機能解析には実用的ではない。従って、これまでのノックアウト法より有効かつ簡便な、動物個体での遺伝子機能抑制方法を開発することが望まれている。

RNA i (RNA interference) とは、ある遺伝子（標的遺伝子とも称する）の一部をコードするmRNAの一部を二本鎖にしたRNA (double stranded RNA: dsRNA) を細胞へ導入すると、標的遺伝子の発現が抑制される現象を言う。1998年、生体内へのDsRNAの導入が導入遺伝子と同じ遺伝子の発現に対して抑制作用を持つことが、線虫において発見された (Fire et al., Nature, 391, 806-811, 1998)。

その後、RNA i は、真菌類、植物 *Nicotiana tabaccum* と *Oryza sativa*、プラナリア、トリパノソーマ *Trypanosoma brucei* (Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E.)、ハエ *Drosophila melanogaster* (Kennerdell and Carthew, 1998) 及び脊椎動物であるゼブラフィッシュでも観察され、RNA i は種を越えて普遍的に存在する現象であると考えられるようになった。

RNA i の技術的応用については、線虫において、遺伝子ノックアウト技術として確立し、線虫全ゲノム配列決定計画により得られた全塩基配列情報を用いた

ゲノム機能解析の主要な手段として利用されている (Fraser et al., Nature, 408, 325-330, 2000; Gonczy et al., Nature 408, 331-336, 2000)。哺乳動物のゲノム機能解析においても、遺伝子ノックアウトより時間的、労力的に負担の少ない方法として、効率的な遺伝子発現抑制の方法として期待されている。

哺乳類では、マウスの初期胚 (wianny and Zernicka-Goetz, Nature Cell Biol., 2, 70-75, 2000) に dsRNA をインジェクションする実験において RNA i 効果が初めて報告されたが、その効果は初期胚に限られ、誕生した時には RNA i 効果が消失していた。この理由としては、1細胞期受精卵に導入した dsRNA が胚の分割増殖に依存して希釈され、RNA i に必要な濃度を維持できなくなっていると考えられているが、その他、哺乳類には生物学的に線虫と異なるメカニズムが存在する可能性もある。

本発明者らは、導入した dsRNA の細胞内濃度を維持することを目的として、逆向き反復配列を含む遺伝子を哺乳類発現ベクターの下流に連結した遺伝子を構築し、受精卵へ導入し、胚をマウス卵管へ移植することにより dsRNA 発現ベクター遺伝子導入マウスを作成した。このマウスにおいては、標的遺伝子発現の抑制された表現型を示す個体が観察されたが、その取得効率は数%であり、RNA i 効果を用いてマウス個体において遺伝子機能解析を行うためにはさらなる改良が望まれる。

RNA i 関連遺伝子を同定する試みとしては、線虫の RNA i に対する感受性を欠く変異体を選択することにより、4つの RNA i 関連遺伝子座、rde-1~rde-4 (rde; RNA interference-deficient) が同定された。Rde-1 遺伝子は 1,020 個のアミノ酸からなる蛋白質 (RDE-1) をコードする。線虫のゲノム中には少なくとも 22 個の rde-1 遺伝子に相同な塩基配列を持つ遺伝子があり、遺伝子ファミリーを形成している。それらはアラビドシスの *zwille* (=pinhead) や *argonaut1*、ショウジョウバエの *sting* や *piwi*、ウサギの *eIF2C* 遺伝子とも相同性を示す。

RNA i 関連遺伝子を同定するもう一つの方法として、既存の線虫突然変異株に対する RNA i 感受性が調べられた。その結果、2つのミューテーター株 (ト

ランスポゾン転移頻度が高くなるような変異を持つ株) mut-2 と mut-7 においては、主として生殖系列における RNA i の活性が顕著に減少していることがわかった。Mut-7 産物の配列はバクテリアの RnaseD やヒトの Werner-syndrome 蛋白質 3', 5' ヌクレアーゼドメインと相同性を示す。いくつかの実験より、RNA i における mRNA の分解は、mut-7 産物をはじめとする多くの蛋白質を含む複合体の触媒作用によって起こる可能性が示唆されている。

このほかに線虫においては、卵形成異常を示す ego-1 変異体の原因遺伝子が RNA i においても重要な役割をはたしていることが示唆されている。EGO-1 蛋白質はトマトの RNA-directed RNA polymerase (RdRP) やアカパンカビの gene quelling に働く QDE-1 と相同な配列を持つ。

さらに、Hannon らはショウジョウバエの RNaseIII ファミリーに属するヌクレアーゼの一つが dsRNA を 22 ヌクレオチドの RNA 断片に切断する活性を持ち、RNA i の活性に必要であることを報告している。Dicer と名付けられたこのヌクレアーゼは 2 つの RNaseIII モチーフと N 末端にヘリカーゼドメインを持つ。

Dicer には RNaseIII モチーフのほかに PAZ ドメインと呼ばれる領域がある。PAZ ドメインは RNA i に関与することが予想されるいくつかの因子 (Piwi, Argo, Zwillie/Pinhead) に共通に含まれる。その機能は今のところ明らかになっていないが、蛋白質-蛋白質相互作用に働くものと考えられている。

上記の通り、RNA i に関与する因子の報告はあるが、それらを実際に利用して RNA i 効果を生体内で増強したという報告はない。

## 発明の開示

本発明は、個体での遺伝子機能解析に用いることが可能な、RNA i 効果が増強された ES 細胞並びに哺乳動物個体を取得することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、より高い RNA i 効果を導き出すことを目的として培養細胞 (ES 細胞) を用いて RNA i 効果の検討を行った。まずは、ES 細胞において RNA i 効果を確認し、その後、RNA i 効

果の高感受性化の達成を図ることとした。

具体的には、先ず、ニワトリベータグロビン遺伝子インスレーター配列の一部（240塩基対）、CMVエンハンサー、ヒトEF1 $\alpha$ プロモーターの下流に種々のRNAiに関与する遺伝子を連結し、その後にSV40ポリA付加シグナルを持ち、さらにloxP配列ではさんだピューロマイシン耐性遺伝子を構築した。そして、この遺伝子をEGFP発現ES細胞株へ導入した。この細胞株を用いてEGFPdsRNA発現遺伝子の一過性発現時におけるEGFP蛍光を検討したところ、RNAi関連遺伝子導入前のコントロールES細胞株と比較して、EGFP蛍光が減少した細胞群の比率が上昇することを見出した。即ち、本発明者らは、RNAiに関与する遺伝子を導入したことにより、RNAi高感受性ES細胞株を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

さらに、このRNAi高感受性ES細胞株をマウスブラストシスト胚に導入し、子宮へ移植するという常法に従い、トランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスはRNAi高感受性であり、EGFP蛍光の減少がより強く観察されるものである。即ち、本発明により作製したRNAi高感受性ES細胞は、マウスブラストシスト胚へ導入することにより、そのES細胞の性質を持つマウス個体の作成が可能である。

即ち、本発明によれば、ES細胞に遺伝子操作を施すことにより得られる、増強したRNAi効果を有するES細胞が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、

ES細胞にRNAi関連遺伝子を導入することにより得られるES細胞；

RNAi関連遺伝子が、配列特異的な中間体の形成に関与する因子をコードする遺伝子、標的遺伝子発現抑制段階に関与する因子をコードする遺伝子、RNA依存RNAポリメラーゼをコードする遺伝子、またはヘリカーゼをコードする遺伝子である、ES細胞；

RNAi関連遺伝子が、線虫rde-1又はrde-4遺伝子、カビqde-2遺伝子、アラビドシスago-1遺伝子、Dicer遺伝子又はそのホモログ遺伝子、PAZ/Piwiファ

ミリーの蛋白等をコードする遺伝子、線虫 Mut-7 遺伝子、線虫 rde-2 遺伝子、カビ qde-1 遺伝子、線虫 ego-1 遺伝子、アラビドシス sgs2/sde1 遺伝子、カビ qde-3 遺伝子、線虫 smg-2 遺伝子、クラミドマス mut6 遺伝子、またはアラビドシス sde3 遺伝子である、ES細胞；

RNA i 関連遺伝子が、線虫 rde-1 遺伝子又は線虫 Mut-7 遺伝子である、ES細胞；

RNA i 関連遺伝子を宿主細胞内で発現可能な状態で有する発現ベクターをES細胞に導入することにより得られる、ES細胞；

哺乳動物細胞で発現可能な標的遺伝子の逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子をさらに有している、ES細胞；

逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、哺乳動物細胞で作動可能なプロモーター配列の下流に標的遺伝子の逆向き反復配列を含む、ES細胞；

逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、プロモーター配列の上流にエンハンサー配列を含む、ES細胞；

逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、さらにインスレーター配列又はその一部を含む、ES細胞；

逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、標的遺伝子の逆向き反復配列の下流にポリA付加シグナル配列を含む、ES細胞；

標的遺伝子が、外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子である、ES細胞；

外来性レポータータンパク質が、Enhanced green fluorescent protein (EGFP) である、ES細胞；及び

受託番号FERM BP-8208 (FERM P-18574より移管) またはFERM BP-8209 (FERM P-18575より移管) を有するES細胞；

が提供される。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のES細胞から派生した非ヒト哺

乳動物個体又はその子孫又はその一部が提供される。

好ましくは、非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびサルから成る群から選ばれる非ヒト哺乳動物である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、pCE HPRT IR コンストラクションの構築を示す。

図 2 は、pUC19 5' INS240 CE pA ベクターの構造を示す。

図 3 は、pBS/loxP/PUR0 ベクターの構造を示す。

図 4 は、pUC19/5' INS240/CE/mut-7/loxP/PUR0 ベクターの構造を示す。

図 5 は、pUC19/5' INS240/CE/rde-1/loxP/PUR0 ベクターの構造を示す。

図 6 は、遺伝子導入 E S 細胞株の RNA i 効果 (1) を示す。

d2EGFP 発現 E S 細胞株 d2GFP32 に rde-1 発現遺伝子を導入した細胞株へ pUC19 5' INS240 CE EGFP (黒)、pCE HPRT IR (グレー) をトランスフェクトし、24 時間後に回収した細胞のフローサイトメトリー解析結果である。

図 7 は、遺伝子導入 E S 細胞株の RNA i 効果 (2) を示す。

EGFP 発現 E S 細胞株 GFP11 に rde-1 発現遺伝子を導入した細胞株へ pUC19 5' INS240 CE EGFP (黒)、pCE HPRT IR (グレー) をトランスフェクトし、24 時間後に回収した細胞のフローサイトメトリー解析結果である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

##### (1) RNA i 関連遺伝子について

本発明の E S 細胞は、増強した RNA i 効果を有することを特徴とするものであり、E S 細胞に遺伝子操作を施すことにより得られる。

遺伝子操作としては、E S 細胞に RNA i 効果を増強させる遺伝子 (即ち、RNA i 関連遺伝子) を導入すること、あるいは E S 細胞に存在する RNA i 効果

を抑制する遺伝子の発現を抑制するための遺伝子操作などが挙げられる。

RNA i 感受性を上昇させる可能性がある遺伝子、即ち、RNA i 効果を増強させる遺伝子としては以下のものがある。

RNA i は線虫で発見されたが、その後ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスでも報告されている。一方、植物では post-transcriptional gene silencing (PTGS)、カビにおいては gene quilling と報告された現象と同様のメカニズムが存在することが明らかとなっている。

RNA i メカニズム第 1 段階の、配列特異的な中間体の形成に関与する因子として、以下のものが考えられている。

線虫 rde-1、rde-4 (rde ; RNA interference-deficient) 遺伝子 (Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C.C. : Cell. 99, 123-132, 1999 ) 。

Rde-1 遺伝子は piwi/sting/avgonaute/Zwille/eIF2C 遺伝子ファミリーに属す。Rde-1 のカビホモログとしては、qde-2 遺伝子 (Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C., Nature 404, 245 16 Mar. 2000) が、アラビドシスホモログとしては ago-1 が報告されている。

Dicer はショウジョウバエの RNaseIII ファミリーに属するヌクレアーゼの 1 つであり、線虫、アラビドシス、ヒト、分裂酵母などにホモログが発見されている (Bernstein, E., Caudy, A., A., Hamond S. M., Hannon, G. J. : Nature, 409, 363-366, 2001) 。

その他の配列特異的中間体のコンポーネントとしては Dicer に相互作用する PAZ/Piwi ファミリーの蛋白等 (Hammond, S., M., Boettcher, D., Caudy, A., Kobayashi, R., Hannon, G., J., Science, 2001, 293, 1146-1150) が挙げられる。

一方、標的遺伝子発現抑制段階に関与する因子として、以下のものが考えられる。

線虫 Mut-7 (Ketting, R. F., Harverkamp, T. H. A., van Luenen, H. G. A. M.,



Plasterk, R. H. A. : Cell. 99, 1) は RnaseD に相同な配列を持つ 3', 5' エクソヌクレアーゼである。また、線虫 rde-2 (Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C.C. : Cell. 99, 123-132, 1999) もこの段階に関与する。

また、RNA 依存 RNA ポリメラーゼとしては、カビにおいて qde-1、線虫において ego-1、アラビドシスにおいて sgs2/sde1 等のホモログが報告されている (Matzke, M., A., Matzke A., J., M., Pruss, G., and Vance, V., Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 221, 2001)。しかしながら、その正確な役割はまだ明らかになっていない。

さらに、変異株の解析から、ヘリカーゼに分類される酵素が RNA i に関与していることも報告されている。カビでは qde-3 (Cogoni, C., Macino, G., Science, 286, 2342-2344, 1999)、線虫では smg-2 (Domeier, M., E., Morse, D., P., Knight, S., W., Porteiko, M., Bass, B., L., Mango, S., E., Science, 289, 1928-1931, 2000)、クラミドマスでは mut6 (Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C., Cerutti, H., Science, 290, 1159-1162, 2000)、アラビドシスでは sde3 (dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T., H., Baulcombe, D., C., EMBO J., 20, 2069-2078) 等である。

DsRNA をプロセスする他の経路の存在も示唆されている。PTGS の植物ウイルス抑制因子である、HC-Pro (helper component proteinase) は PTGS に必要な siRNA (短鎖抑制 RNA) の蓄積を阻害する (Mallory M., F., Matzke, A., Matzke, M., Curr. Biol., 11, 1119, 2001、Llave, C., Kasschau, K., D., Carrington, C., Proc. Natul. Acad. Sci. U.S.A. 97, 13401, 2001)。このように、RNA i 感受性を減少させる因子の場合は、遺伝子操作によりその発現を抑制することにより、RNA i 感受性を上昇させることが可能と推定される。

RNA-directed DNA methylase も RNA i における標的 mRNA にガイドする RNA に類似の低分子 RNA に分解される dsRNA を必要とする (Mette, M., F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M., A., Matzke, A., J., M., EMBO J. 19, 5194, 2000)。

## (2) RNA i 関連遺伝子のES細胞への導入

本発明のES細胞 (Embryonic Stem Cells) は、例えば、以下のような操作により作製することができる。

即ち、RNA i 関連遺伝子を取得し、これをES細胞内で発現可能な状態で有する発現ベクターを構築する。次いで、この発現ベクターを発生学的に全能性を持つ、未分化な細胞であるES細胞に導入する。そして、導入したRNA i 関連遺伝子の発現によりRNA i 効果が増強されたES細胞を単離する。

RNA i 関連遺伝子を含む発現ベクターとしては、RNA i 関連遺伝子をES細胞内で発現させることができるものであればその種類は特に限定されない。発現ベクターの構築は当業者であれば適宜行うことができる。一般的には、哺乳動物で作動可能なプロモーター配列の下流にRNA i 関連遺伝子が存在する。このような構成をとることにより、哺乳動物の細胞内においてRNA i 関連遺伝子を発現させることが可能になる。また、発現ベクターは、プロモーター配列の上流にエンハンサー配列を含んでいてもよい。さらに、発現ベクターは、インスレーター配列又はその一部を含んでいてもよい。発現ベクターの構築のために使用することができるプロモーター配列、エンハンサー配列、インスレーター配列としては、例えば、標的遺伝子の逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子について本明細書中後記するものの中から好適なものを選択して使用することもできる。

RNA i 関連遺伝子を有する発現ベクターのES細胞への導入は、エレクトロポレーション法などを用いて常法にしたがって行うことができる。なお、ES細胞とは動物胚盤胞の内部細胞塊より樹立された発生学的全能性を持つ未分化な細胞であり、初期胚に戻してやると宿主胚の細胞と渾然一体となり発生を続けるという性質を有する。本発明で用いるES細胞の種類は特に限定されず、ES細胞の由来する動物も特に限定されないが、好ましくは哺乳動物であり、例えば、ヒトでもよいし、あるいはマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびサルなどの非ヒト哺乳動物で

もよい。

RNAi 関連遺伝子を有する発現ベクターを導入するES細胞は、生殖細胞への分化能を失わないように未分化の状態で培養維持することが好ましい。そのためには、培地に適当な栄養細胞をフィーダー細胞として加え、また、ヒトLIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加し、さらに牛胎児血清、ヌクレオシド、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールなどを添加して培養することが好ましい。栄養細胞としては、STO細胞かマウス胎児繊維芽細胞などが適当である。

エレクトロポレーション法でES細胞に発現ベクターを挿入するには、ES細胞を一定の濃度になるように緩衝液に浮遊させ、適当な制限酵素で処理して線状化したRNAi 関連遺伝子を有する発現ベクターを添加し、適当なエレクトロポレーション装置を用いて適当な条件下でエレクトロポレーションを行うことが好ましい。緩衝液としては、PBS等を用いてpHを7.0に調整するのが好ましい。

RNAi 関連遺伝子を有する発現ベクターを導入した後、ES細胞を、上記の培地で24時間程度培養し、その後選別に用いる薬剤（例えば抗生物質など）を含む培地と交換する。薬剤添加培地は1日ごとに新しいものに交換することが好ましく、約1週間培養を続ける。その後、発現ベクターを導入して得られた薬剤耐性のクローンを拾い上げ、所望の性質を有するクローンを単離する。単離したES細胞が、実際に増強したRNAi 効果を有しているか否かは、適当なRNAi 評価系において確認することができる。

### (3) 逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子を用いたRNAi 評価系

RNAi は、哺乳動物細胞で発現可能な標的遺伝子の逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子を用いて評価することができる。即ち、このような構造を有する組み換え遺伝子を哺乳動物の細胞に導入することにより、細胞内で標的遺伝子の逆向き反復配列を発現させることができ、これによりRNAi (RNA interference) 効果により標的遺伝子の発現を抑制することが可能になる。このようなRNAi 評価系をES細胞を用いて構築した後、RNAi 関連遺伝子を有

する発現ベクターを該E S細胞に導入し、RNA i 効果による標的遺伝子の抑制の程度が増強するかどうかを評価することができる。

逆向き反復配列とは、標的遺伝子並びにその逆向きの配列が適当な配列を介して並列している配列を言う。具体的には、標的遺伝子が、以下に示すn個の塩基配列から成る2本鎖を有する場合、



その逆向き配列は以下の配列を有する。



(ここで、Xで表される塩基とYで表される塩基において、添え字の数字が同じものは互いに相補的な塩基である)

逆向き反復配列は上記2種の配列が適当な配列を介して配列である。逆向き反復配列としては、標的遺伝子の配列が逆向き配列の上流にある場合と、逆向き配列が標的遺伝子の配列の上流にある場合の2つの場合が考えられる。本発明で用いる逆向き反復配列は上記の何れでもよいが、好ましくは、逆向き配列が標的遺伝子の配列の上流に存在する。

標的遺伝子の配列とその逆向き配列の間に存在する配列は、RNAに転写された際にヘアピンループを形成する領域である。この領域の長さは、ヘアピンループを形成できる限り特には限定されないが、一般的には、0bpから700bpであり、好ましくは0～300bp程度、より好ましくは0～100bp程度である。この配列の中には制限酵素部位が存在していてもよい。

本発明で用いる標的遺伝子としては任意の遺伝子を使用できる。組み換え遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作成し、RNA i による遺伝子ノックアウトを意図する場合には、標的遺伝子は発現を抑制することを意図する遺伝子(ノックアウトを意図する遺伝子)である。このような標的遺伝子としては、クローニングはされているが機能が未知の遺伝子も含まれる。

あるいは、標的遺伝子は、外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子であってもよい。このような外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子を標的遺伝子として使用した場合は、組み換え遺伝子を用いたトランスジェニック技術においてRNA i 効果を容易に検出及び評価することができる。

外来性レポータータンパク質としては、エンハンスド・グリーン・フルオレッセント・プロテイン (Enhanced green fluorescent protein)、グリーン・フルオレッセント・プロテイン (Green fluorescent protein)、エクオリン、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼなどが挙げられる。

外来性レポータータンパク質の変異タンパク質としては、上記した野生型のレポータータンパク質のアミノ酸配列中に1～複数個（例えば1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入を有するタンパク質であって、好ましくは野生型のレポータータンパク質と同等以上の機能を維持している。

レポータータンパク質の変異タンパク質の遺伝子として具体的には、レポータータンパク質の遺伝子中の塩基配列の一部が欠損した遺伝子、レポーター遺伝子の塩基配列が他の塩基配列で置換された遺伝子、レポーター遺伝子の一部に他の塩基配列が挿入された遺伝子などが用いられる。欠損、置換または付加を受ける塩基の数は、特に限定されないが、通常、1ないし60個程度、好ましくは1から30個程度、より好ましくは1ないし10個程度である。なお、これらの変異遺伝子は、レポーター遺伝子としての機能を維持していることが望ましい。

変異タンパク質の遺伝子は、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することができる。具体的には、天然型レポータータンパク質をコードするDNAに対して変異原となる薬剤を接触作用させたり、紫外線を照射したり、あるいはPCR法などの遺伝子工学的手法を用いることにより変異タンパク質をコードする遺伝子を取得することができる。遺伝子

工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから特に有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、及び Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて実施することができる。

本発明で用いることができる組み換え遺伝子では、哺乳動物で作動可能なプロモーター配列の下流に標的遺伝子の逆向き反復配列が存在する。このような構成をとることにより、哺乳動物の細胞内において標的遺伝子の逆向き反復配列を発現させることが可能になる。即ち、本発明で用いることができる組み換え遺伝子では、標的遺伝子の逆向き反復配列は上記プロモーターの制御下に置かれるように配置されている。

本発明で用いるプロモーター配列は、哺乳動物で作動可能であれば特に限定されない。

このように非ヒト動物で発現可能なプロモーターとしては、例えば、ウィルス（例、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルスなど）由来遺伝子プロモーター、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーターなどが用いられる。各哺乳動物由来のプロモーターとしては、例えば、アルブミン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパクキナーゼβサブユニット（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), Vol. 271, No. 3, pp1638-1644, 1996)、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミンβ-水酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), Vol. 270, No. 43, pp25739-25745, 1995 および同 Vol. 272, No. 40, pp25112-25120, 1997)、メタロチオネイン、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、平滑筋αアクチン、ポリペプチド鎖延長因子1α (EF-1α)、βアクチン、αおよびβミオシ

ン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイドPコンポーネント、レニンなどのプロモーターが用いられる。

上記以外にも、例えば、Molecular Medicine 臨時増刊号、マニュアル疾患モデルマウス；山村研一、勝木元也、相沢慎一編、中山書店等の文献に記載されているプロモーターも使用することができる。

本発明で用いるのに好ましいプロモーターとしては、本明細書の実施例で使用したヒト EF1 $\alpha$  プロモーターが挙げられるが、それ以外にも以下のものが挙げられる。

#### (1) $\beta$ アクチンプロモーター

一般的にはCMVエンハンサーと $\beta$ アクチンプロモーターの組み合わせとして使用される。例えば、pCAGGS;chicken beta-actin promoter and cytomegalo virus enhancer. beta-actin intron and bovine globin poly-adenylation signal など。引用文献としては、H. Niwa, K. Yamanami, J. Miyazaki, Gene, 108, (1991)193-199 を参照。

#### (2) CMVプロモーター

一般的には、CMVエンハンサーとCMVプロモーターの組み合わせとして使用される。引用文献としては、Janet A. Sawicki et al Experimental Cell Research 244, 367-369 (1998)を参照。

#### (3) メタロチオネインプロモーター

引用文献としては、Establishment of Transgenic Mice Carrying Human Fetus-Specific CYP3A7 Yong Li, et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 329, No. 2, 235-240, 1996 を参照。

#### (4) Apolipoprotein E プロモーター

胎児肝臓での発現を意図したプロモーター。引用文献としては、Simonet et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 8221-8229 を参照。

#### (5) 導入したい遺伝子本来のプロモーター

この場合は、ゲノムそのものを導入することによりトランスジェニックマウス

を作成する場合は挙げられる。引用文献としては、Okamoto M., et al., J. Exp. Med., 175, 71 (1992)を参照。

本発明で用いることができる組み換え遺伝子は、プロモーター配列の上流にエンハンサー配列を含んでいてもよい。使用できるエンハンサー配列としては上記したCMVエンハンサーなどが挙げられる。

本発明で用いることができる組み換え遺伝子は、インスレーター配列又はその一部を含んでいてもよい。インスレーター配列とは、トランスジェニック動物においては、「位置効果」からの遺伝子発現の抑制から守る遺伝子配列のことである。近隣のシスエレメントの影響に対するバリアとして期待されている。

インスレーター配列又はその一部の位置は特に限定されないが、導入遺伝子(即ち、標的遺伝子の逆向き反復配列)の5'側(上流)に存在することが、効果の面から好ましい。最も好ましくは、インスレーター配列又はその一部は、プロモーター配列の上流(又はエンハンサー配列が存在する場合にはその上流)に存在する。

本発明で使用するインスレーター配列としては、本明細書の実施例で使したニワトリベータグロビン由来インスレーター配列の他にも以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(1) ショウジョウバエ *scs* および *scs'* 配列

Rebecca Kellum and Paul Schedl, Cell, Vol. 64, 941-950, March 8, 1991

(2) ショウジョウバエ *gypsy* トランスポゾンのインスレーター配列

Holdrige, C., and D. Dorsett, 1991 Mol. Cell. Biol. 11: 1894-1900

(3) ウニアリルサルファターゼインスレータ配列

Koji Akasaka, et. al., Cellular and Molecular Biology 45 (5), 555-565, 1999

(4) ヒトT細胞レセプター $\alpha/\delta$  遺伝子座 BEAD エレメント

Zhong, X. P., and M. S. Krangel, 1997 Proc. Natul. Acad. Sci. USA

(5) ヒトアポリポ蛋白B-100 (apoB) マトリックスアタッチメント部位

Namciu et al, 1998, Mol. Cell. Biol. 18: 2382-2391



本発明で用いることができる組み換え遺伝子は、標的遺伝子の逆向き反復配列の下流にポリ A 付加シグナル配列を含んでいてもよい。ポリ A 付加シグナル配列を挿入することにより、目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結することができる。

ポリ A 付加シグナル配列の具体例としては、SV40 ポリ A 付加シグナルなどが挙げられるが、これに限定されるわけではない。

上記した方法により作製された細胞の具体例として、クローン d2 GFP・r6 #5 は受託番号 FERM P-18574 として、クローン GFP・r19 #4 は受託番号 FERM P-18575 として、平成13年10月31日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託されている。

受託番号 FERM P-18574 として寄託されたクローン d2 GFP・r6 #5 は、平成14年(2002年)10月16日付けにて受託番号 FERM BP-8208 として国際寄託に移管され、受託番号 FERM P-18575 として寄託されたクローン GFP・r19 #4 は、平成14年(2002年)10月16日付けにて受託番号 FERM BP-8209 として国際寄託に移管された。これらの細胞は、マウス胚性幹細胞としての万能性を有し、EGFP 蛋白質を発現して緑色蛍光を発し、線虫の遺伝子 rde-1 を発現して RNA i 高感受性を示す。

#### (4) RNA i 効果が増強された非ヒト哺乳動物個体

本発明においては、上記により取得された RNA i 効果が増強された ES 細胞を動物胚へ注入し、仮親の子宮に移植して生殖系列のキメラ動物を得ることができる。このキメラ動物を正常な動物と交配させるとヘテロ接合体動物 (+/-) が得られ、ヘテロ接合体同士を交配させるとホモ接合体動物 (-/-) を得ることができる。この方法により、RNA i 効果が増強されている哺乳動物個体を得ることができる。

哺乳動物個体の種類は非ヒト哺乳動物であれば特に限定されず、具体例としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびサルなどを挙げることができる。

RNA i 効果が増強されている哺乳動物の作製は、具体的には以下のように行なうことができる。まず、動物の胚に、ヘテロ接合体ES細胞を注入し、*in vitro*で培養した後、仮親の子宮に移植する。ここで、動物の胚は、8細胞期胚ー胚盤胞が用いることが好ましい。ES細胞は通常10～15個程度を注入する。こうして、ES細胞を注入された胚は、*in vitro*で培養した後、仮親の子宮に移植する。上記の方法によって妊娠した仮親から生まれた子のうちキメラ動物を選ぶ。キメラの寄与率の高いキメラ動物は生殖系列のキメラ動物である可能性が高いが、キメラ動物を正常動物と交配することにより、生殖系列のキメラ動物であることの確認が可能である。このようにして生殖系列のキメラ動物であるヘテロ接合体動物が得られ、ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体動物を得ることができる。このようにして得られた動物は、RNA i 効果が増強されているという特徴を有する。

RNA i 関連遺伝子が胚芽細胞を含むすべての細胞の染色体上に組み込まれたトランスジェニック哺乳動物の遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、同様に該遺伝子を有する。導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該遺伝子を安定に保持し、また、該遺伝子を有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

本出願の優先権主張の基礎となる出願である特願2001-348705号の明細書に開示した内容は全て引用により本明細書に開示したものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例 1 : d2EGFP E S 細胞の樹立及び RNA i 効果測定系の構築

標的遺伝子を EGFP とした場合、EGFP の半減期が 24 時間以上であるので、EGFP の翻訳レベルが減少しても、EGFP dsRNA 導入前に翻訳された持ち込みの EGFP にマスクされているうちに RNA i 効果自体が見えなくなっている可能性がある。

そこで、EGFP 蛋白の半減期が 2 時間になるように改良を施した EGFP (d2EGFP、クロンテック社 pd2EGFP-1) を用いて、新たに E S 細胞トランスフェクタントを樹立した。樹立に用いた d2EGFP 発現ベクターは、クロンテック社 pd2EGFP-1 マルチクローニングサイト中の Bam HI サイトに、pUC19 5', 3' INS240CE EGFP (特願 2001-046089 号明細書に記載のもの; 構築方法は以下に記載する) の 5' インスレーター配列、CMV エンハンサー配列、EF-1 $\alpha$  配列を含む Bam HI フラグメントを正向きに挿入することにより作製し、pd2EGFP 5' INS240 CE と命名した。

pUC19 5', 3' INS240CE EGFP は下記の通り構築した。pUC19 5', 3' INS240 (ニワトリベータグロビン由来インスレーター配列の遺伝子を 10 本のフラグメントに分けて化学合成後、DNA Ligase で結合させた 240 塩基対のフラグメントを pUC19 ベクターのマルチクローニングサイトへ挿入したベクター) の XhoI、Afl II 部位へ pCE-EGFP-1 (文献名: Takada, T., 他、Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. Nature Biotech. 15: 458-461, 1997) の XhoI - Afl II 間断片を 2 段階で挿入して、ライゲーションし、大腸菌 JM109 株をトランスフォームして、プラスミド pUC19 5', 3' INS240 CE EGFP を得た。

上記で作製したベクター pd2EGFP 5' INS240 CE を、制限酵素 EcoRI、Bsa I を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動にて大腸菌由来の配列と分離した。得られた遺伝子断片を用いて、CCE E S 細胞 (Tetracarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical Approach, Robertson EJ. IRL Press: London, pp.71-112, 1987) をエレクトロポレーション法 (BTX 社製 ECM600 遺伝子導入装置) にてトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を 250  $\mu$ g/ml ネオマイシン存在下でセレクションし、得られたコロニーについて、蛍光顕微鏡にて EGFP

蛍光が陽性であることを確認後、d2EGFP E S細胞株とした。E S細胞の培養は、上記 Robertson EJ の方法に従った。

RNA i 効果の検出は以下の手法で行った。フィーダー細胞上で増殖させた各 E S細胞をトリプシン-EDTA で剥がし、ゼラチンコートプレートに  $2.1 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> の濃度でまき込み、培養した。24 時間後の細胞に、EGFP dsRNA 発現遺伝子（逆向き反復配列遺伝子）を持つプラスミド pUC19 5' INS240 EGFP IR を、遺伝子導入試薬リポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクションした。コントロールとして、HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) dsRNA 発現遺伝子（逆向き反復配列遺伝子）を持つプラスミドを用いて同様のトランスフェクション操作を行った。24 時間後に、トリプシン-EDTA を用いて細胞を回収し、シングルセルにした後、FACScan (BD 社) により、細胞の蛍光を解析した。

EGFP dsRNA 発現遺伝子（逆向き反復配列遺伝子）を持つプラスミド pUC19 5' INS240 EGFP IR は特願 2001-046089 号明細書に記載されたものを使用した。即ち、上記で作製した pUC19 5', 3' INS240 CE EGFP の KpnI、SalI 切断部位へ Litmus28 EGFP の Kpn I-Xho I 断片を挿入後、ライゲーションし、大腸菌 SURE2 株（ストラタジーン社）をトランスホームして、逆向き反復配列を持つプラスミド pUC19 5' INS240 CE EGFP IR を得た。

コントロールとして用いた HPRT dsRNA 発現遺伝子は以下に示す手法で構築した（図 1）。

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 遺伝子は ATCC No. 37424 を購入し、制限酵素 Age I および Bal I で切出し、Litmus28 ベクターへクローニングした。このベクターを鋳型に用い、制限酵素 CpoI または SfiI 部位を含むプライマー（配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3、配列番号 4）で PCR を行った。PCR 条件は 93°C 3min, (93°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min) x25, 72°C 10min とした。得られた DNA 断片を CpoI or SfiI 処理し、アガロースゲルで電気泳動後 DNA 断片を回収した。また、東京大学大学院理学研究科の善野助教授より供与された pSC 3 ベクター (FEBS Letters 479, 79-82, 2000) を CpoI 処理し、アガロースゲル

で電気泳動後、DNA断片を回収した。HPRT DNA断片-CpoIをpSC3ベクター-CpoIにライゲーションし、大腸菌 JM109 株を形質転換して、プラスミド pSC3-HPRTCpoIを得た。次に pSC3-HPRTCpoIをSfiI処理し、アガロースゲルで電気泳動後 DNA断片を回収した。HPRT DNA断片-SfiIをpSC3-HPRTCpoI-SfiIにライゲーションし、大腸菌 SURE2 株（ストラタジーン社）を形質転換して、逆向き反復配列をもつプラスミド pSC3-HPRTCpoI-SfiIを得た。

さらに、プラスミド pSC3-HPRTCpoI-SfiIをNotI処理し、アガロースゲルで電気泳動後、約 1.7kbp の DNA断片を回収した。次に、pUC19 5' INS240 CE/EGFP IR（特願 2001-046089 号明細書に記載、上記の通り）をNotI処理後、EGFP IR断片を切り出し、セルフライゲーションを行うことで、pUC19 5' INS240 CEpAベクターを作成した。このpUC19 5' INS240 CE pAベクターをNotI処理した後、セルフライゲーションを防ぐためBAPにより脱リン酸化処理し、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、BAPを除去した。

pSC3-HPRTCpoI-SfiI-NotIをpUC19 5' INS240 CEpAベクター-NotIサイトにライゲーションし、大腸菌 SURE2 株（ストラタジーン社）を形質転換して、逆向き反復配列をもつプラスミド pCE HPRT IRを得た。

## 実施例 2：RNA i 関連遺伝子を有する発現ベクターカセットの構築

哺乳動物細胞内で種々のRNA i 関連遺伝子を発現させるため、CMV エンハンサー、EF-1 $\alpha$ プロモーターでドライブし、ピューロマイシン耐性遺伝子を持つカセットベクターを作製した。

即ち、pUC19 5' INS240 CE pAベクターのEcoRIサイトにSpe I-BssHII-EcoRIリンカー（配列番号 5 及び 6）を挿入し、SwaIサイトにXbaI-SalI-SwaIリンカー（配列番号 7 および 8）を挿入することで、pUC19 5' INS240 CEpA XSSベクターを作成した。（図 2）

### (A) Mut-7 発現遺伝子の作製

#### (1) mut-7 遺伝子のクローニング

mut-7 遺伝子 (GENEBANK 配列番号; ZK1098) のクローニングは東京大学理学部・杉本助手より供与された酵母発現用 *C. elegans* cDNA ライブラリー (Genes to Cells 3, 189-202 (1998)) を用いて行った。この cDNA ライブラリーを大腸菌株 XL-10 Gold (STRATAGENE) にトランスフォームしコロニーハイブリダイゼーションを行った。プローブには cDNA library を鋳型にし、PCR によって増幅した mut-7 cDNA の 5' 側領域 (配列番号 9 及び 10) のプローブを用いた。その結果、mut-7 クローンを 2 クローン取得し、BssHII/BamHI で cDNA 領域を切り出し Litmus28 (New England Biolabs 社) の BssHII/BamHI サイトに挿入し、L28/mut-7 を作製した。相互のクローン間で、BglII/PstI を用いた組み替えを行い、アミノ酸変異を持たない完全長の ORF を含む cDNA クローンを取得した。引き続き L28/mut-7 の SpeI/EcoRI cDNA 断片を Litmus38 (New England Biolabs 社) の NheI/EcoRI サイトに挿入することによって L38/mut-7 を得た。

#### (2) ベクターへの mut-7 遺伝子の導入

pUC19 5' INS240 CE pAXSS ベクターの BssHII/EcoRI サイトに L38/mut-7 の MluI/EcoRI 断片を挿入し、pUC19 5' INS240 CE/mut-7 を得た。このプラスミドを用いて大腸菌株 SCS110 (STRATAGENE 社) をトランスフォームし、脱メチル化されたプラスミドを得た。

#### (3) PBS/LoxP/Puro の構築

PLoxP (Kitamoto T. et. al., Biochem. And Biophys. Res. Commun. 222, 742-747 (1996)) の BamHI サイトを制限酵素処理後、ブラント化、セルフライゲーションすることによってつぶし、続いて HindIII サイトに BglII リンカー (配列番号 11) を挿入して HindIII サイトを BglII サイトに改変した。このベクターの EcoRV/BglII サイトに pPUR (CLONTECH 社) の PvuII/BamHI 断片を挿入し、pBS/loxP/Puro を得た (図 3)。

#### (4) pUC19 5' INS240 CE/mut-7/loxP/Puro の構築

pUC19 5' INS240 CE/mut-7 の XbaI/SalI サイトに、pBS/loxP/Puro の SpeI/XhoI 断片を挿入し、pUC19 5' INS240 CE/mut-7/loxP/Puro を得た。このプラスミドを

BamHI 処理することによって約 6.5kb の遺伝子断片を得た。

## (B) rde-1 発現遺伝子の作製

### (1) rde-1 遺伝子の取得

rde-1 の cDNA クローンは国立遺伝研・小原先生より GENE BANK の遺伝子番号 AF180730 を元に供与された。このファージクローンから、in vivo excision によって pBluescriptSK-/rde-1 を得た。

### (2) ベクターの構築

pUC19 5' INS240 CEpAXSS の BssHII サイトに BssHII-NotI-EcoRV-NheI-KpnI リンカー（配列番号 1 2 及び 1 3）を挿入し、SwaI サイトに SwaI-AscI-PacI リンカー（配列番号 1 4 及び 1 5）を、また NsiI サイトに NsiI-AscI-PacI リンカー（配列番号 1 6 及び 1 7）を挿入した。さらに、XbaI/SalI サイトに、pBS/loxP/Puro の SpeI/XhoI 断片を挿入し、pUC19 5' INS240 CE/BNENK/loxP/Puro を得た（図 3）。

### (3) pUC19 5' INS240 CE/rde-1/loxP/Puro の構築

pUC19 5' INS240 CE/BNENK/loxP/Puro の KpnI/NotI サイトに pBluescriptSK-/rde-1 の KpnI/NotI 断片を挿入し、pUC19 5' INS240 CE/rde-1/loxP/Puro を得た（図 5）。このプラスミドを PacI 処理することによって約 7.0kb の遺伝子断片を得た。

## 実施例 3 : mut-7 発現 E S 細胞株の樹立

精製した mut-7 発現遺伝子を用いて、エレクトロポレーション法により、d2EGFP 発現 E S 細胞株へ導入した。その後、600ng/ml ピューロマイシン存在下でセレクションを行い、細胞株を得た。さらに細胞から DNA を調製し、mut-7 遺伝子の存在をサザンハイブリダイゼーションにおいて、予想される異動度のバンドを得たクローンをポジティブクローンとした。同様な方法で、半減期が 24 時間以上である、2 箇所のアミノ酸置換（Phe-64 を Leu、Ser-65 を Thr）を持つ GFPmut1 バリ

アントを EF-1 $\alpha$  プロモーターでドライブする E S 細胞株 (Takada, T., Yoshida, K., Nakamura, K., Nakao, K., Tujimoto, G., Katsuki, M., Sugano, S., Expression of Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. Methods in Enzymology 302:, 233-250, 1999) に mut-7 発現遺伝子を導入し、ポジティブクローンを得た。

#### 実施例 4 : rde-1 発現 E S 細胞株の樹立

精製した rde-1 発現遺伝子を用いて、エレクトロポレーション法により、d2EGFP 発現 E S 細胞へ導入した。その後、ピューロマイシンに対する薬剤耐性でセクションし、細胞株を得た。さらに細胞から DNA を調製し、rde-1 遺伝子の存在をサザンハイブリダイゼーションにおいて、予想される異動度のバンドを得たクローンをポジティブクローンとした。同様な方法で、E S 細胞株 (Takada, T., Yoshida, K., Nakamura, K., Nakao, K., Tujimoto, G., Katsuki, M., Sugano, S., Expression of Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. Methods in Enzymology 302:, 233-250, 1999) に rde-1 発現遺伝子を導入し、ポジティブクローンを得た。

得られた rde-1 発現 E S 細胞のうち、クローン d 2 GFP・r 6 # 5 は受託番号 FERM P-18574 として、クローン GFP・r 19 # 4 は受託番号 FERM P-18575 として、平成 13 年 10 月 31 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番地 1 中央第 6) に寄託されている。

受託番号 FERM P-18574 として寄託されたクローン d 2 GFP・r 6 # 5 は、平成 14 年 (2002 年) 10 月 16 日付けにて受託番号 FERM BP-8208 として国際寄託に移管され、受託番号 FERM P-18575 として寄託されたクローン GFP・r 19 # 4 は、平成 14 年 (2002 年) 10 月 16 日付けにて受託番号 FERM BP-8209 として国際寄託に移管された。



### 実施例5：RNA i 関連遺伝子発現ES細胞株のRNA i 効果解析

フィーダー細胞上で増殖させた各ES細胞をトリプシン-EDTAで剥がし、ゼラチンコートプレートに $2.1 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>の濃度でまき込み、培養した。24時間後の細胞に、EGFP dsRNA 発現遺伝子（逆向き反復配列遺伝子）を持つプラスミド pUC19 5' INS240 EGFP IR を、遺伝子導入試薬リポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクションした。コントロールとして、HPRT（Hypoxanthine phosphoribosyltransferase）dsRNA 発現遺伝子（逆向き反復配列遺伝子）を持つプラスミドを用いて同様のトランスフェクション操作を行った。24時間後に、トリプシン-EDTA を用いて細胞を回収し、シングルセルにした後、FACSscan（BD 社）により、細胞の蛍光を解析した。

クローン d 2 GFP・r 6 # 5 において、蛍光減少細胞がコントロール細胞に比較し、10%増加する結果を得た（図6）。

また、EGFP ES細胞株に rde-1 遺伝子を導入して取得した細胞株であるクローン GFP・r 1 9 # 4 において、遺伝子導入を行っていないコントロール細胞株に比べ、蛍光減少細胞群が 28%上昇する結果を得た（図7）。

### 実施例6：ES細胞からのキメラマウス作成

フィーダー細胞上で増殖させた各ES細胞をトリプシン-EDTA で剥がした後、ゼラチンコートプレート上でフィーダー細胞を接着除去し、インジェクション用培地（DMEM 20% FBS）に懸濁した。

ES細胞を C57BL/6 と BDF1 を交配して得た受精卵、blastocyst 胚へインジェクションし、偽妊娠 MCH マウスの子宮へ移植し、キメラマウスを得た。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規遺伝子の遺伝子機能を、胎児、実験動物個体で解析する場合、従来のノックアウト法よりも迅速に結果を得ることができる、さらに、RN

A i 効果を用いた疾病等の関連遺伝子の解析、医薬品の標的遺伝子の解析等において、これまでのマウスよりもより確実に遺伝子の抑制が可能となり、産業上大いに貢献すると考えられる。

## 請求の範囲

1. ES細胞に遺伝子操作を施すことにより得られる、増強したRNA i 効果を有するES細胞。
2. ES細胞にRNA i 関連遺伝子を導入することにより得られる、請求項1に記載のES細胞。
3. RNA i 関連遺伝子が、配列特異的な中間体の形成に関与する因子をコードする遺伝子、標的遺伝子発現抑制段階に関与する因子をコードする遺伝子、RNA 依存 RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子、またはヘリカーゼをコードする遺伝子である、請求項1または2に記載のES細胞。
4. RNA i 関連遺伝子が、線虫 rde-1 又は rde-4 遺伝子、カビ qde-2 遺伝子、アラビドシス ago-1 遺伝子、Dicer 遺伝子又はそのホモログ遺伝子、PAZ/Piwi ファミリーの蛋白等をコードする遺伝子、線虫 Mut-7 遺伝子、線虫 rde-2 遺伝子、カビ qde-1 遺伝子、線虫 ego-1 遺伝子、アラビドシス sgs2/sde1 遺伝子、カビ qde-3 遺伝子、線虫 smg-2 遺伝子、クラミドマス mut6 遺伝子、またはアラビドシス sde3 遺伝子である、請求項2又は3に記載のES細胞。
5. RNA i 関連遺伝子が、線虫 rde-1 遺伝子又は線虫 Mut-7 遺伝子である、請求項4に記載のES細胞。
6. RNA i 関連遺伝子を宿主細胞内で発現可能な状態で有する発現ベクターをES細胞に導入することにより得られる、請求項1から5の何れかに記載のES細胞。
7. 哺乳動物細胞で発現可能な標的遺伝子の逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子をさらに有している、請求項1から6の何れかに記載のES細胞。
8. 逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、哺乳動物細胞で作動可能なプロモーター配列の下流に標的遺伝子の逆向き反復配列を含む、請求項7に記載のES細胞。
9. 逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、プロモーター配列の上流にエ

ンハンサー配列を含む、請求項 7 又は 8 に記載の E S 細胞。

10. 逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、さらにインスレーター配列又はその一部を含む、請求項 7 から 9 の何れかに記載の E S 細胞。

11. 逆向き反復配列を含む組み換え遺伝子が、標的遺伝子の逆向き反復配列の下流にポリ A 付加シグナル配列を含む、請求項 7 から 10 の何れかに記載の E S 細胞。

12. 標的遺伝子が、外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子である、請求項 7 から 11 の何れかに記載の E S 細胞。

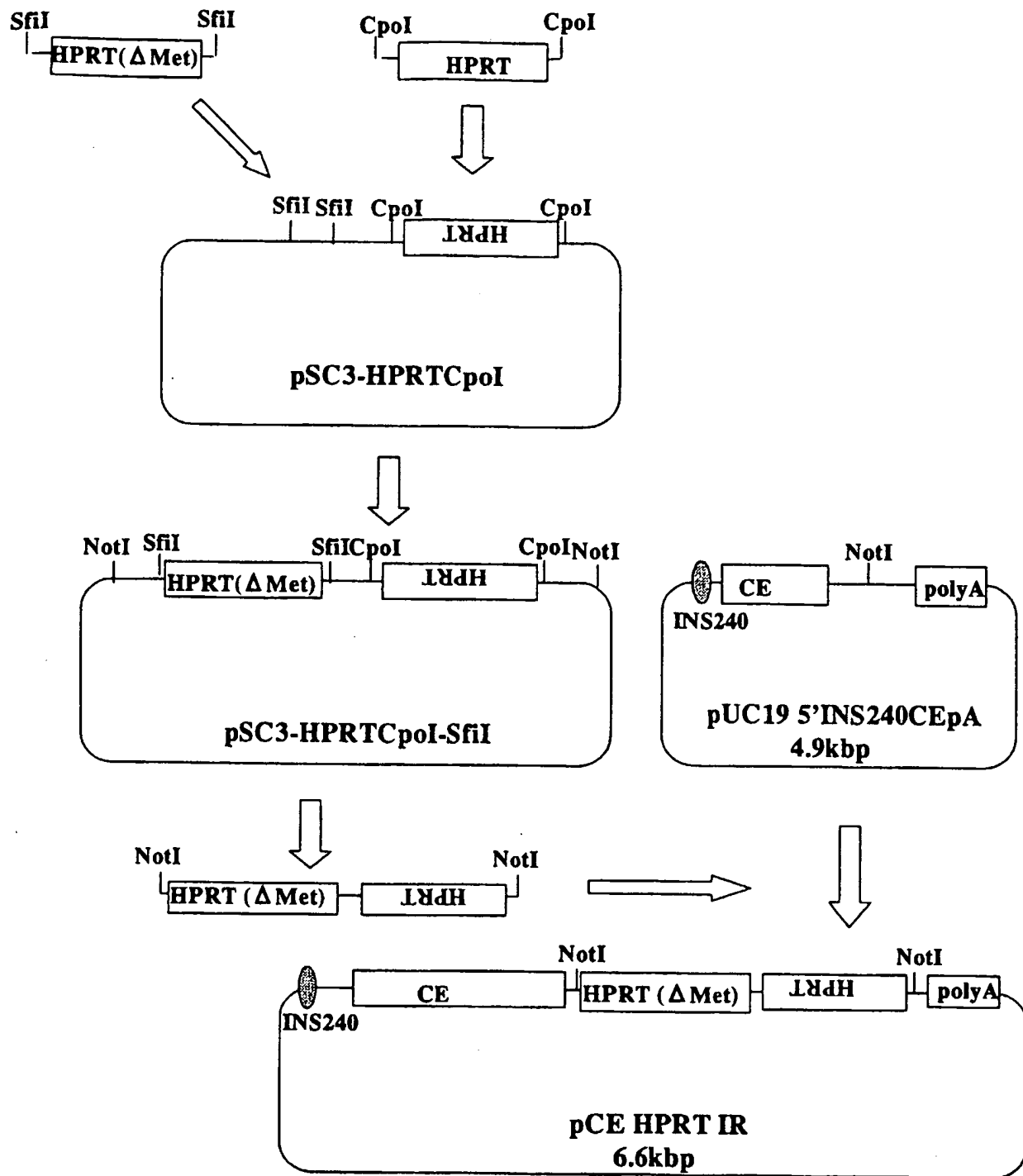
13. 外来性レポータータンパク質が、Enhanced green fluorescent protien (EGFP) である、請求項 12 に記載の E S 細胞。

14. 受託番号 FERM BP-8208 (FERM P-18574 より移管) または FERM BP-8209 (FERM P-18575 より移管) を有する E S 細胞。

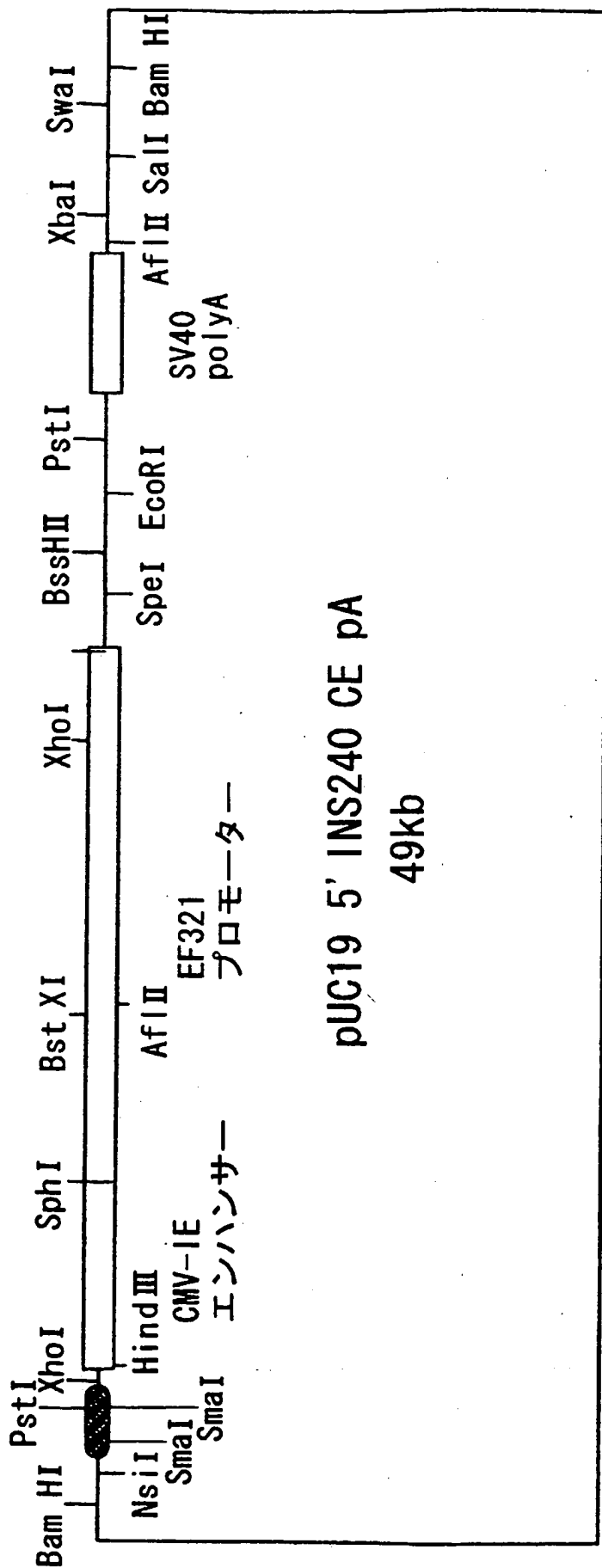
15. 請求項 1 から 14 の何れかに記載の E S 細胞から派生した非ヒト哺乳動物個体又はその子孫又はその一部。

16. 非ヒト哺乳動物が、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびサルから成る群から選ばれる非ヒト哺乳動物である、請求項 15 に記載の非ヒト哺乳動物個体又はその子孫又はその一部。

☒ 1

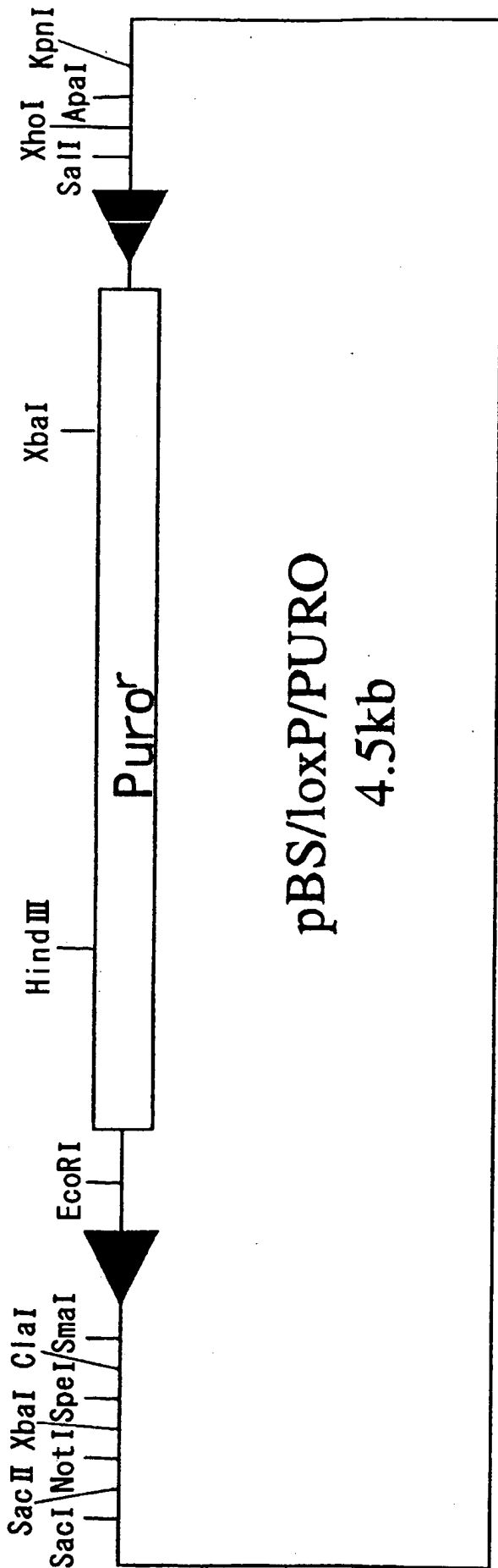


2



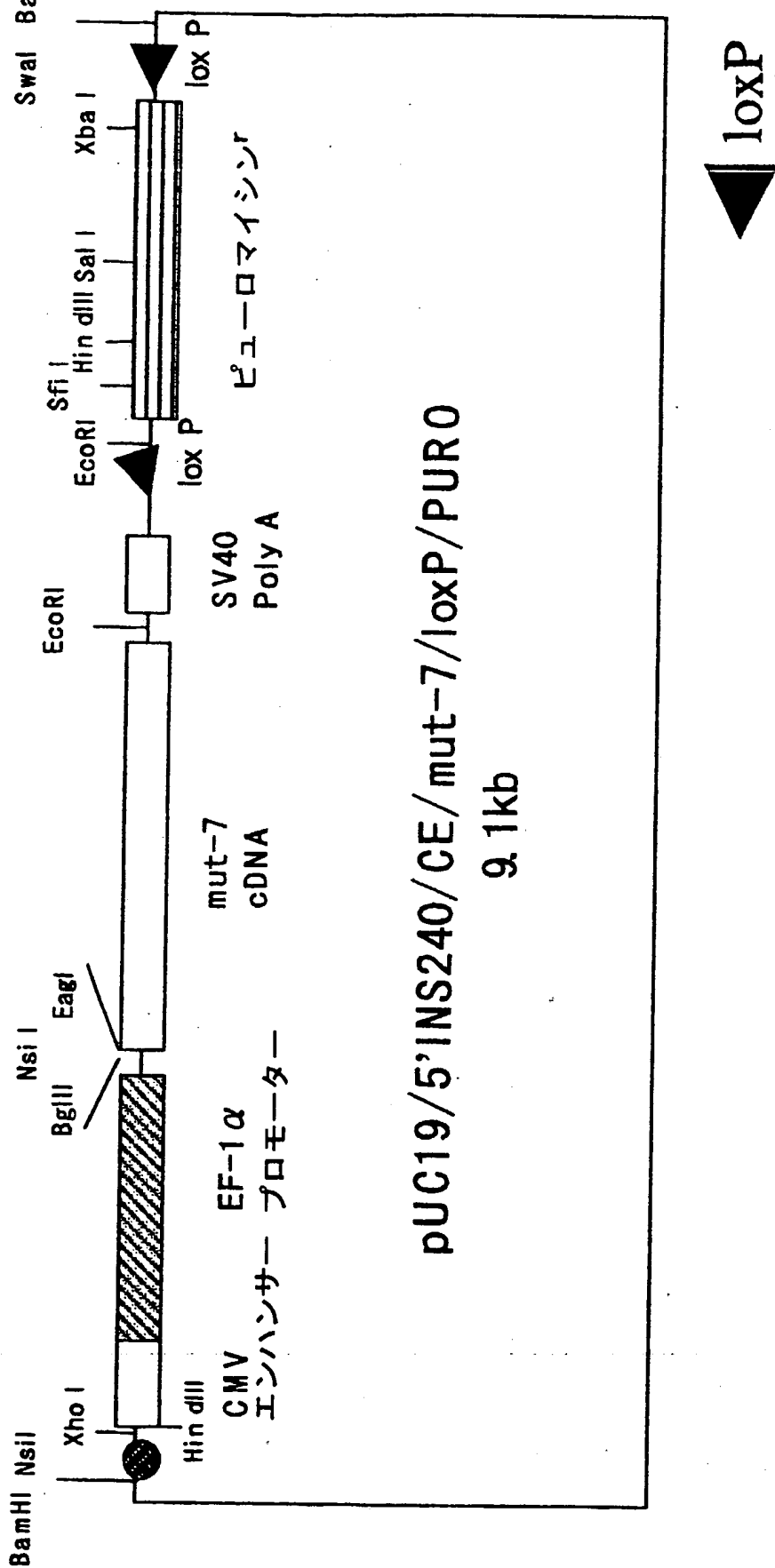
インシュレーター-240bp

3



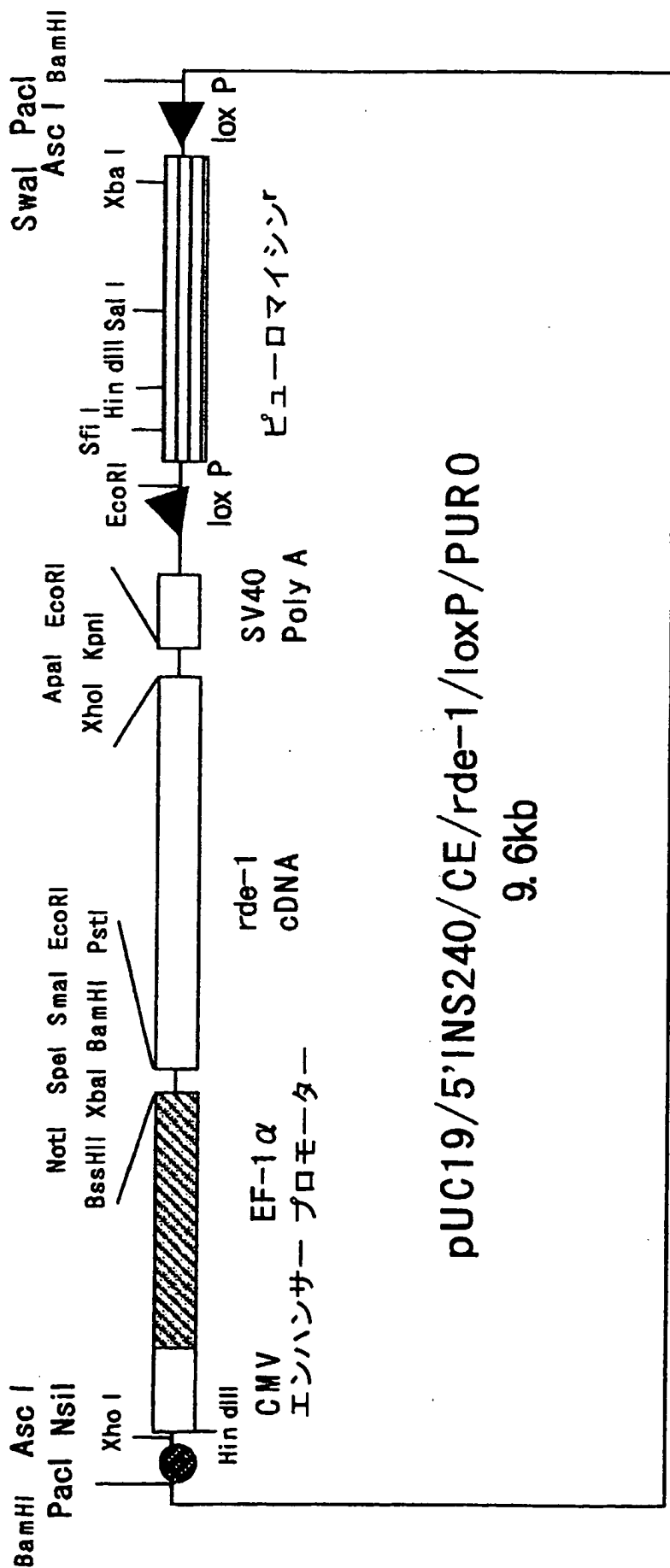
loxP

# Swal BamHI





5



loxP

図 6

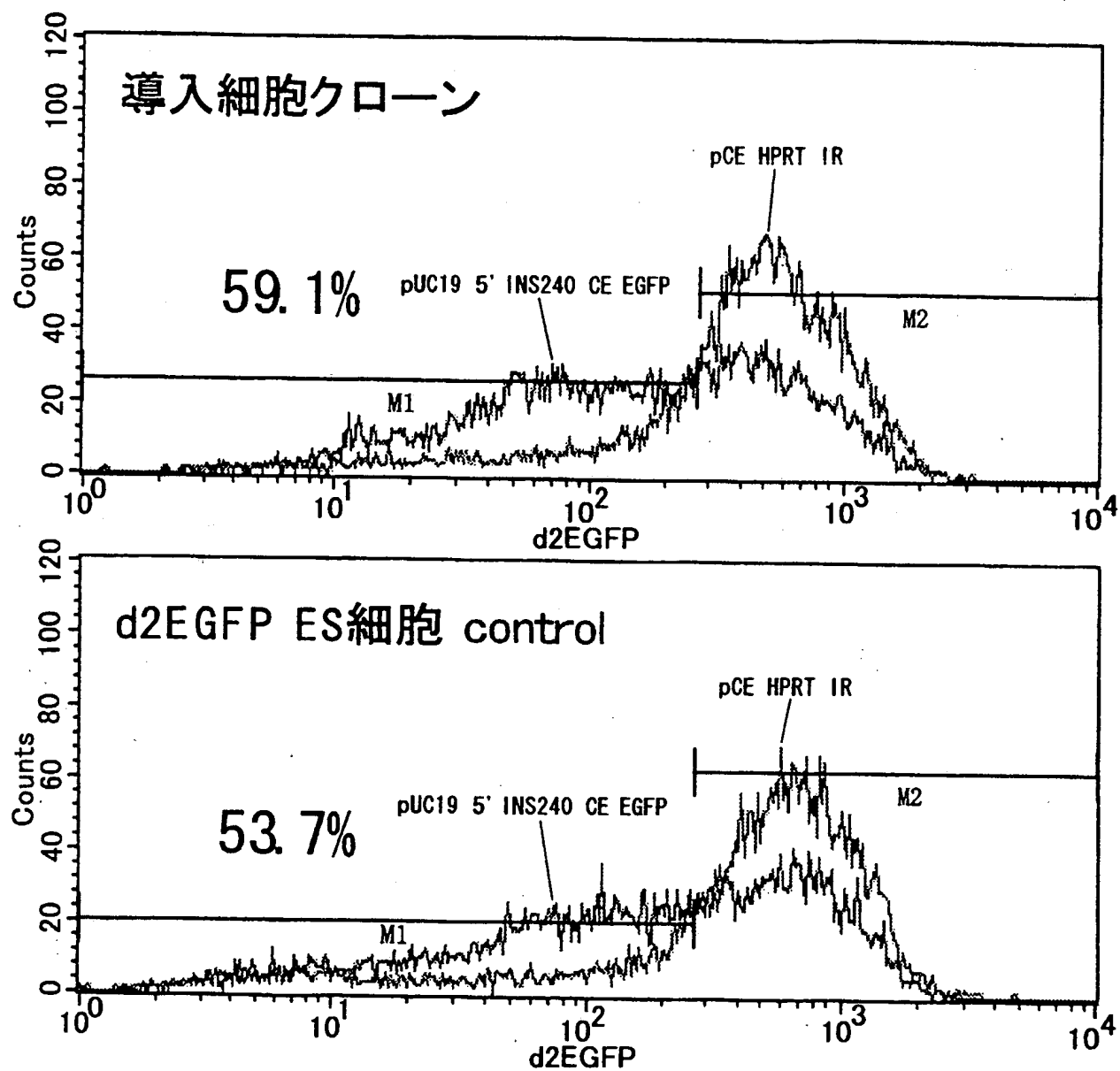
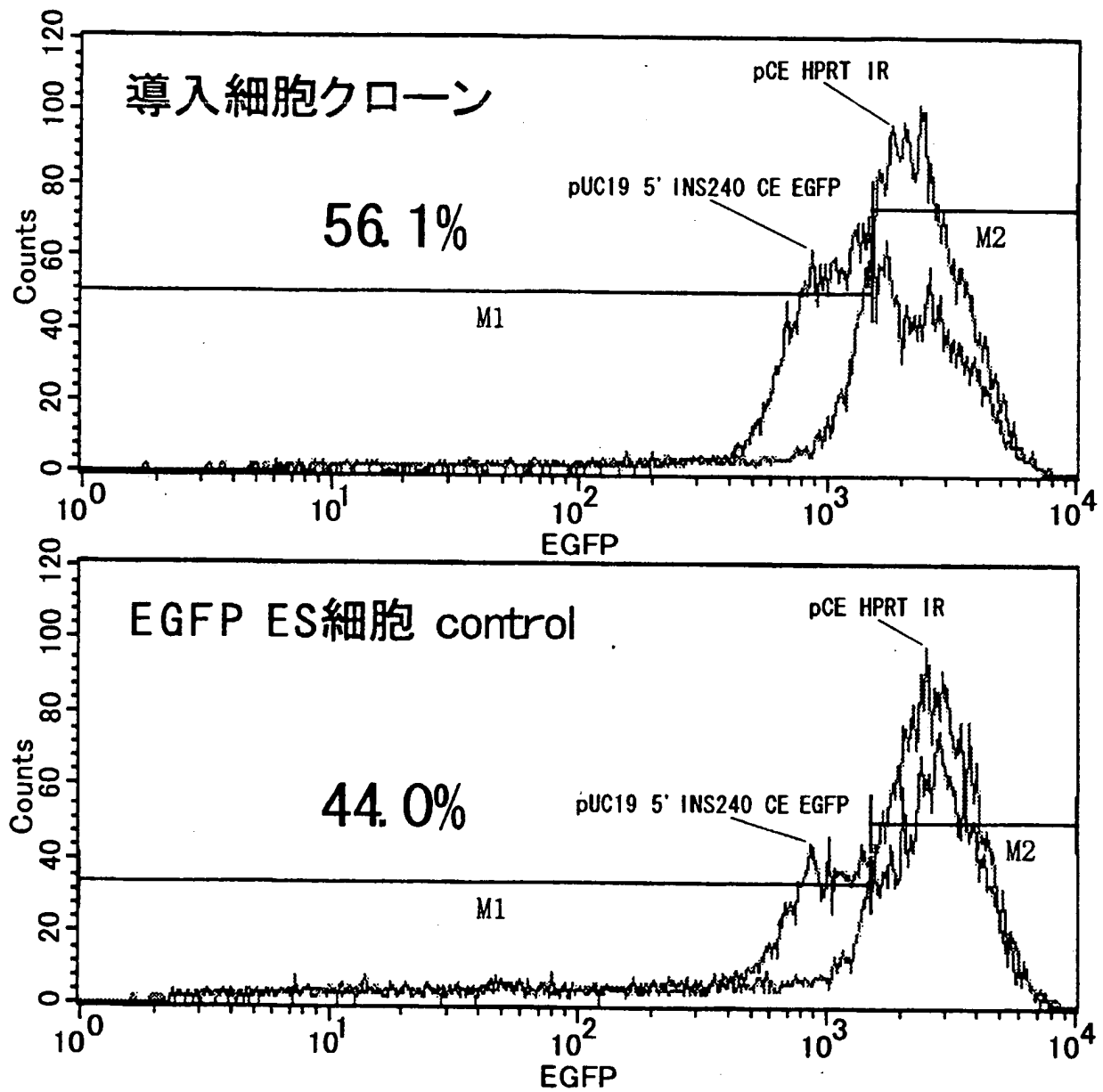


図 7



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GenCom

&lt;120&gt; ES cell having an enhanced RNAi effect

&lt;130&gt; A21594A

&lt;160&gt; 17

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

ggccatatag gccccgaccc gcagtcccag cgtcg 35

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

ggcctacatg gccttaggct ttgtatttgg cttttcca 38

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

cggtcgatg ccgacccgca gtcccagcgt cg 32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

cggaccgtta ggctttgtat ttggcttttc ca 32

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

aattgactag tgcgcgcatg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

aattcatgcg cgcactagtc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

attctagatc gtcgacattt

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

aaatgtcgac gatctagaat

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ccggaagtt ctgaaagcaa

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

tagccatatt tgcagcaacg

20

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

agctcagatc tg

12

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

cgcgcgagcgg ccgcgatatc agctagcagg tacca 35

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

cgcggtgttac ctgctagctg atatcgcggc cgctg 35

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

aaatggcgcg ccttaattaa gc 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gcttaattaa ggcgcgccat tt 22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

tggcgcgcct taattaactg ca 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gttaattaag ggcgcgcatg ca 22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11831

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG, S. et al., Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Mol.Cell.Biol. (Nov.2001), Vol.21, No.22, pages 7807 to 7816	1-16
Y	BILLY, E. et al., Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. (Dec.2001), Vol.98, No.25, pages 14428 to 14433	1-16
Y	WO 01/68836 A2 (GENETICA INC.), 20 September, 2001 (20.09.01), Full text & AU 200145793 A & US 2002/0162126 A1	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 February, 2003 (10.02.03)

Date of mailing of the international search report  
25 February, 2003 (25.02.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11831

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 02/66638 A1 (Gencom Corp.), 29 August, 2002 (29.08.02), Full text (Family: none)	1-16
Y	KETTING, RF. et al., Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. Genes Dev. (Oct.2001), Vol.15, No.20, pages 2654 to 2659	1-16
Y	GRISHOK, A. et al., Genetic requirements for inheritance of RNAi in C. elegans. Science(2000), Vol.287, No.5462, pages 2494 to 2497	1-16
Y	DERNBURG, AF. et al., Transgene-mediated cosuppression in the C. elegans germ line. Genes Dev. (2000), Vol.14, No.13, pages 1578 to 1583	1-16
Y	FAGARD, M. et al., AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. Proc.Natl.Acad.Sci. USA(2000), Vol.97, No.21, pages 11650 to 11654	1-16
Y	KWON, JY. et al., Biological significance of a universally conserved transcription mediator in metazoan developmental signaling pathways. Development(Aug.2001), Vol.128, No.16, pages 3095 to 3104	1-16
Y	EP 859059 A2 (NAT. INST. ANIMAL IND.), 19 August, 1998 (19.08.98), Full text & JP 10-191975 A                      & US 5834269 A & JP 2000-116378 A	1-16

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 5/10, A01K 67/027

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 5/10, A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YANG, S. et al. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. (Nov. 2001) Vol. 21, No. 22, p. 7807-7816	1-16
Y	BILLY, E. et al. Specific interference with gene expression in induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (Dec. 2001) Vol. 98, No. 25, p. 14428-14433	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.02.03

国際調査報告の発送日

25.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹



4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/68836 A2 (GENETICA INC.) 2001.09.20, 全文 & AU 200145793 A & US 2002/0162126 A1	1-16
P, Y	WO 02/66638 A1 (GENCOM CORP.) 2002.08.29, 全文 (ファミリーなし)	1-16
Y	KETTING, RF. et al., Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in <i>C. elegans</i> . Genes Dev. (Oct. 2001) Vol. 15, No. 20, p. 2654-2659	1-16
Y	GRISHOK, A. et al., Genetic requirements for inheritance of RNAi in <i>C. elegans</i> . Science(2000) Vol. 287, No. 5462, p. 2494-2497	1-16
Y	DERNBURG, AF. et al., Transgene-mediated cosuppression in the <i>C. elegans</i> germ line. Genes Dev. (2000) Vol. 14, No. 13, p. 1578-1583	1-16
Y	FAGARD, M. et al., AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000) Vol. 97, No. 21, p. 11650-11654	1-16
Y	KWON, JY. et al., Biological significance of a universally conserved transcription mediator in metazoan developmental signaling pathways. Development(Aug. 2001) Vol. 128, No. 16, p. 3095-3104	1-16
Y	EP 859059 A2 (NAT. INST. ANIMAL IND.) 1998.08.19, 全文 & JP 10-191975 A & US 5834269 A & JP 2000-116378 A	1-16